

L'Hémogramme

Les populations cellulaires sanguines circulantes (globules rouges, globules blancs et plaquettes) peuvent être quantifiées par des méthodes analytiques manuelles ou automatisées. L'hémogramme comprend des variables biologiques mesurées ou calculées mais également des données morphologiques(1-5). Il est classiquement constitué par:

- la numération des éléments figurés sanguins (hématies, leucocytes et plaquettes)
- l'hématocrite - Packed Cell Volume (PCV)
- l'hémoglobine
- le volume globulaire moyen (VGM) ou Mean Corpuscular Volume (MCV)
- la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) ou Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)
- la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) ou Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)
- la formule leucocytaire
- l'examen du frottis sanguin

D'autres paramètres peuvent être présents:

- le pourcentage ou la numération des réticulocytes
- des index de maturation de la population des réticulocytes fonctions de leur contenu en ARN
- l'indice de distribution des globules rouges (IDR) ou Red blood cells Distribution Width (RDW)
- le volume moyen plaquettaire (VMP) ou Mean Platelet Volume (MPV)
- le plaquettoctrite
- l'indice de distribution des plaquettes (IDP) ou Platelets Distribution Width (PDW)

I. Le prélèvement sanguin

I.1. Anticoagulant

Généralement 2,5 ou 5 ml de sang veineux* sont prélevés dans des tubes contenant un sel éthylène diamine tétracétique (EDTA) à la concentration de 1mg/ml. Si le système seringue-aiguille est utilisé, l'aiguille doit être retirée avant le transfert du sang dans le tube contenant l'anticoagulant pour éviter de lyser les cellules. L'héparine est déconseillée car elle ne prévient pas l'agrégation des plaquettes et entraîne des modifications dans la morphologie des globules blancs.

Sang et anticoagulant doivent être correctement mélangés par retournement du tube une douzaine de fois. Il est important de noter l'état de l'animal (calme ou agité, anesthésié, déshydraté...) au moment du prélèvement.

*le sang capillaire est parfois préféré car il est enrichi en certains parasites comme Babesia.

I.2. Stabilité et manipulation du spécimen

En pratique vétérinaire, un hémogramme est réalisé rapidement après le prélèvement sanguin ou selon les recommandations, dans les 24 heures(2, 6) à partir de spécimens conservés à 4°C, comme en médecine humaine.(7, 8) Cependant, dans de nombreux cas, les spécimens ne peuvent être traités dans des délais aussi brefs en raison de leur envoi postal à un laboratoire de biologie médicale ou en raison d'une interruption de service pendant le week-end par exemple. Dans de tels contextes, les tubes sont conservés souvent 48h avant d'être analysés. Ceci soulève des questions quant à la stabilité des variables hématologiques mesurées et sur la validité de l'interprétation des résultats, en particulier pour des tubes conservés à température ambiante.

I.3. Le frottis sanguin

Actuellement, de nombreux automates d'hématologie fournissent les numérations leucocytaire, érythrocytaire et plaquettaire et sont capables pour certains d'entre eux de donner une formule leucocytaire.

L'examen du frottis sanguin est souvent négligé, semblant long et fastidieux, et se limite trop souvent à l'observation d'hétoparasites dans les zones géographiques à risques. Le frottis reste néanmoins nécessaire pour confirmer ou infirmer les résultats donnés par l'analyseur. De plus, une approche morphologique attentive des cellules sanguines peut permettre de déceler des éléments d'orientation diagnostique, voire des éléments figurés. Pour cela, il est nécessaire d'avoir un microscope de qualité, des frottis correctement réalisés afin d'éviter les principaux artéfacts, de prendre le temps de colorer les frottis, de savoir les bases théoriques de l'hématopathologie et d'apprendre à reconnaître les modifications morphologiques des cellules sanguines.

Le frottis sanguin est un étalement de sang sur une lame porte-objet qui permet la répartition **régulière** des éléments figurés sur une seule épaisseur, en vue de réaliser :

- une approche morphologique qualitative des éléments figurés,
- une appréciation semi-quantitative du nombre de leucocytes et de plaquettes (normalement une plaquette pour 20 globules rouges),
- la formule leucocytaire (pourcentage relatif des différents types leucocytaires).

1.3.1. Validation des résultats chiffrés par l'automate d'hématologie

L'examen du frottis va permettre la validation des résultats chiffrés fournis par l'automate d'hématologie. Ce paragraphe sera développé de façon exhaustive et appliquée dans divers cours ultérieurs (lecture des résultats des analyseurs d'hématologie, anémies, leucopénies, ...) et n'est abordé ici que sous la forme d'exemples généraux.

Globules rouges

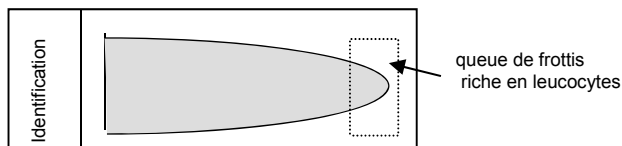
La validation précise de la numération érythrocytaire et/ou de l'hématocrite par l'examen du frottis sanguin reste très difficile ; on peut cependant confirmer une anémie marquée (hématies éloignées les unes des autres sur quasiment la totalité du frottis) ou une polyglobulie (hématies se chevauchant ou en rouleaux sur quasiment la totalité du frottis).

La microcytose et la macrocytose sont respectivement par définition une diminution et une augmentation du volume globulaire moyen. Elles doivent toujours être vérifiées par l'observation du frottis sanguin(9).

Une hypochromie, pour être confirmée, nécessite une lecture du frottis sanguin.

Leucocytes

Avec une bonne reproductibilité au niveau de la technique d'étalement du frottis et un œil un peu habitué, l'examen du frottis permet d'évaluer semi-quantitativement le nombre de globules blancs.



A faible grossissement (x100 ou x200), on observe la queue du frottis, plus riche en leucocytes que le corps du frottis. L'épaisseur relative en leucocytes est proportionnelle à la numération. Si cette technique ne permet pas de compter précisément les leucocytes, elle peut par contre confirmer / infirmer une leucopénie ou une leucocytose(10).

Le frottis sanguin

1- Réalisation

Matériel

SANG : **veineux** prélevé sur E.D.T.A ou éventuellement **capillaire** (plus riche en parasites)

LAMES : une lame **porte-objet** lavée et dégraissée ;
une lame **rodée** de largeur inférieure à celle de la lame porte-objet.

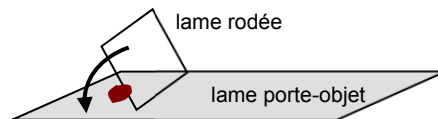
PIPETTE PASTEUR à usage unique

Réalisation du frottis

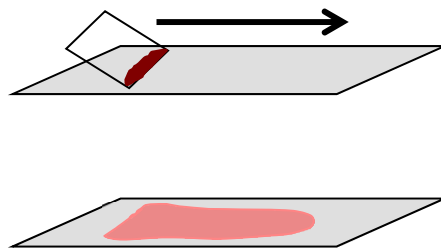
Comme pour l'analyse sanguine par l'automate d'hématologie, il est primordial de bien homogénéiser le sang avant d'en prélever une goutte :

- au moins une vingtaine de retournements du tube sont nécessaires, de façon douce.

1. Déposer avec la pipette Pasteur une goutte de sang de petite taille à l'extrémité de la lame porte-objet
Approcher une lame rodée devant la goutte de sang en formant un angle d'environ 45° avec la lame porte-objet



2. Attendre que le sang se répartisse tout le long du bord de la lame rodée avant de la faire glisser sur la lame porte-objet d'un mouvement ferme et régulier



Étalement :

Ni trop rapide : frottis épais et court

Ni trop lent : frottis trop long,

Mouvement ferme et régulier.

3. **Sécher énergiquement** le frottis à l'air par agitation immédiatement après avoir effectué l'étalement.
Identifier la lame.

Le frottis doit normalement contenir en totalité sur la lame, sa queue n'atteignant pas l'extrémité de celle-ci. Il peut être conservé plusieurs jours à l'abri de la lumière et de la poussière avant d'être coloré.

ARTEFACTS :

Un frottis trop épais ou mal séché fait apparaître de nombreuses hématies très fortement colorées à la périphérie. Un mauvais séchage peut également faire apparaître :

- des échinocytes, globules rouges (GR) dont la surface apparaît « hérissée » de fines projections. Ce changement de morphologie des GR se différencie d'une vraie poikilocytose par le fait qu'un tel artefact affecte tous les GR d'une zone donnée alors qu'une poikilocytose vraie ne touche que quelques GR répartis sur l'ensemble de l'étalement.

- de petites bulles claires réfringentes dans les hématies qui peuvent parfois gêner la lecture et se confondre avec des piroplasmes. Elles correspondraient à une fuite de gaz emprisonné sur le frottis au moment où il sort du GR.

2- Coloration

2.1. Coloration rapide

Bien que ce type de coloration ne permette pas d'obtenir une gamme de couleur aussi variée qu'avec le May-Grünwald Giemsa, il permet une analyse morphologique des cellules sanguines, parfois suffisante, et a surtout l'énorme avantage d'être simple et rapide d'utilisation. Les procédures de coloration peuvent varier selon le kit employé ; il est donc nécessaire de se reporter aux indications du fabricant.

2.2. Coloration avec le May-Grünwald Giemsa

L'avantage de la coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG) par rapport à une coloration rapide est qu'elle permet de mettre en évidence des granulations azurophiles présentes dans certaines cellules hématopoïétiques ; c'est la coloration de choix en hématologie et cytologie. Cette coloration est malheureusement trop souvent incompatible avec la durée d'une consultation, en particulier si le clinicien doit la réaliser lui-même. La technique est cependant relativement simple :

1. Recouvrir la lame, posée horizontalement sur un portoir, avec du **May-Grünwald** pur (solution du commerce) en quantité suffisante pour limiter l'évaporation responsable de dépôts de colorant. Laisser le colorant agir **5 minutes**.
2. Rincer avec de l'eau pour préparation injectable ou éventuellement de l'eau du robinet
3. Diluer **extemporanément** au 1/10 la solution de **Giemsa** dans de l'eau pour préparation injectable (Diluée, cette solution s'altère très vite). Recouvrir la lame avec la solution de Giemsa et laisser agir le colorant **5 à 10 minutes**.
4. Jeter le colorant et rincer à l'eau du robinet.
5. Essuyer le dessous de la lame avec du papier absorbant pour retirer le dépôt de colorant
6. Sécher la lame

- En général, pour toutes les dilutions et rinçages, l'eau du robinet est suffisante. Cependant, si les hématies apparaissent trop grisâtres après coloration par le Giemsa et rinçage, il est possible de mettre sur la lame 1 à 2 ml de solution tamponnée (pH 6,8-7) pendant 10 à 30 secondes, ce qui permet d'éclaircir et de raviver le frottis.

ARTEFACTS :

Des dépôts de colorants sont communément observés et se déposent à la périphérie des GR voire adhérent à leur surface ; ils doivent être différenciés de *Mycoplasma haemofelis* ou *M. Haemominutum* (anciennement dénommés Hémobartonelles). Les dépôts de colorant sont de taille hétérogène ; en jouant sur la mise au point de l'objectif, ils apparaissent réfringents. Pour éviter de tels dépôts : filtrer les colorants, utiliser de petits flacons (type flacon urinaire) afin de changer régulièrement les solutions.

Composition du May-Grünwald Giemsa* :

- mélange de May-Grünwald, éosinate de bleu de méthylène, colore les noyaux acides en bleu et les cytoplasmes basiques en rouge,
- colorant de Giemsa (mélange de Romanovsky), mélange complexe de bleu de méthylène et d'éosinate d'azur et de violet de méthylène, colore les noyaux acides en rouge violacé, les cytoplasmes en bleu ou rose suivant les cellules et les éléments azurophiles en rouge pourpre intense.

Cette technique de coloration polychromatique permet d'obtenir des teintes différentes en fonction de l'affinité des divers organites cellulaires pour les colorants utilisés :

- *Bleu foncé ou basophile* : affinité pour le bleu de méthylène qui est un colorant basique. Il colore les structures acides telles que l'ADN du noyau, l'ARN dans le cytoplasme comme par exemple l'ARN des ribosomes.
- *Rouge pourpre ou azurophile* : affinité pour le colorant azur qui est typique des lysosomes.
- *Rose-orangé ou éosinophile ou acidophile* : affinité pour l'éosine, colorant acide. Il colore les structures basiques et en particulier l'hémoglobine des érythrocytes, certaines granulations des leucocytes.
- *Grisâtre à brunâtre ou neutrophile* : affinité pour un colorant dont le pH a été considéré par erreur neutre et caractéristique des granulations des granulocytes neutrophiles.

*Ganter P., Jolles G. Histochimie normale et pathologique, Tome 2, 1970, Paris Gauthier-Villars.

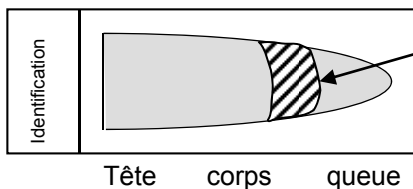
3- Examen du frottis

Le frottis est d'abord observé au **faible grossissement** (x100 ou x200 avec des oculaires x10 et des objectifs x10 ou x20) pour apprécier la répartition des cellules sanguines. Il est aussi utile pour détecter la présence anormale d'agrégats plaquettaires voire leucocytaires, apprécier la richesse en leucocytes (normalement plus nombreux sur les bords et en queue de frottis) et évaluer la population des globules rouges (anisocytose, poïkilocytose, polychromatophilie, hypochromie,...). Le faible grossissement permet également l'observation d'éléments de grande taille (microfilaires, ...).

Il est ensuite examiné en utilisant un **objectif x100 à immersion**, plus particulièrement en fin de corps de frottis, où les globules rouges ne se chevauchent pas, pour réaliser la formule leucocytaire et apprécier la morphologie cellulaire.

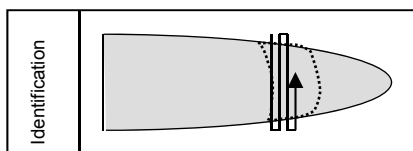
▪ Régions du frottis: tête, corps et queue du frottis.

La morphologie des cellules et leur répartition dépendent de la région du frottis. Il existe une zone d'observation idéale car d'épaisseur optimale, correspondant approximativement au dernier tiers du frottis (en fin de la région du corps), là où les hématies ne se chevauchent pas et sont à peu près équidistantes les unes des autres. Cette zone de lecture est idéale pour réaliser la formule leucocytaire et apprécier les caractéristiques cytologiques des différentes populations cellulaires.



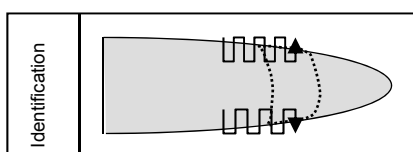
Zone d'observation du frottis au fort grossissement : les globules rouges sont en mono-couche, équidistants les uns des autres ; l'ensemble des cellules sanguines est dispersée de façon homogène.

▪ Méthode de lecture pour réaliser la formule leucocytaire :



Comptage d'au minimum 100 leucocytes par balayage systématique, en créniaux, d'un bord du frottis à l'autre, dans la zone de lecture.

En cas d'hyperleucocytose, il est préférable de compter 200 leucocytes.



En situation de leucopénie, compter par petits créniaux sur les bords du frottis.

Si la leucopénie est sévère, on ne compte pas toujours les cellules mais on regarde quelle(s) population(s) semble(nt) prédominer.

▪ Appréciation de la morphologie cellulaire :

TAILLE : appréciation semi-quantitative de la taille d'une cellule par rapport à celle d'une hématie : entre 6 à 7 μm pour les espèces animales concernées (Chien, Chat, Cheval et Bovin)

► Une cellule sera de petite taille si elle avoisine la taille d'un globule rouge, de taille moyenne si sa taille est comprise entre 10 et 20 μm et de grande taille si elle est supérieure à 20 μm de diamètre.

FORME : arrondie, ovale, irrégulière, avec pseudopodes,...

RAPPORT NUCLEOCYTOPLASMIQUE (RNP) : pourcentage de la surface cellulaire occupée par le noyau: rapport élevé (> 80%), comme par exemple un lymphocyte dont le noyau occupe la presque totalité de la cellule, moyen (50%<rapport< 80%), faible (< 50%).

NOYAU : position dans la cellule (central, excentré), forme (arrondi, encoché, lobé,...), chromatine (fine, perlée, mottée, laquée,...), présence d'éventuels nucléoles (nombre, taille).

CYTOPLASME : couleur, présence, taille, forme et teinte d'éventuelles granulations, présence de vacuoles, phagocytés,...

II. Intervalles de référence

Les intervalles de référence hématologiques du Chien, Chat, Cheval et Bovin adultes et certaines particularités liées à l'âge et à la race sont présentés respectivement dans le Tableau 1 et en Annexes.

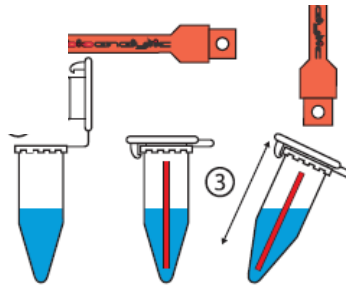
III. Méthodes de mesure manuelles

III.1. Les numérations

Lorsque les résultats de l'analyseur discordent avec la clinique de l'animal et/ou l'examen du frottis sanguin ou qu'une numération précise est nécessaire, les numérations globulaire, leucocytaire et plaquettaire peuvent être effectuées après dilution d'un échantillon sanguin et lecture au microscope à l'aide d'une cellule hématimètre.

La dilution du sang peut être facilitée grâce à l'utilisation d'un kit de dilution spécifique de la population sanguine à dénombrer (Tests unitaires pour numérations cellules sanguines) (Figure 1).

① Pipeter 20µl de sang sous EDTA avec la pipette capillaire. Enlever le sang présent à l'extérieur du capillaire en prenant soin de ne pas absorber le sang destiné à être analysé.



Après agitation du capillaire dans le récipient et une attente d'au moins 30sec (étape 3), le sang dilué est pipeté (toujours après resuspension) avec un autre tube capillaire pour être déposé à l'extrémité d'une cellule hématimètre -comme la cellule de Malassez (Figure 2)- et par capillarité, l'hématimètre se remplit.

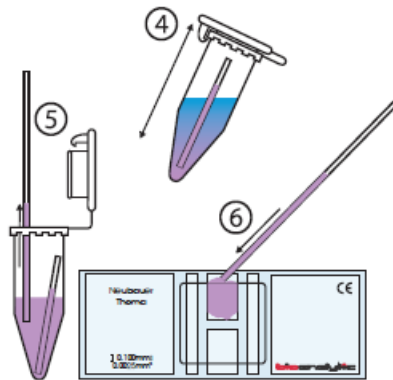
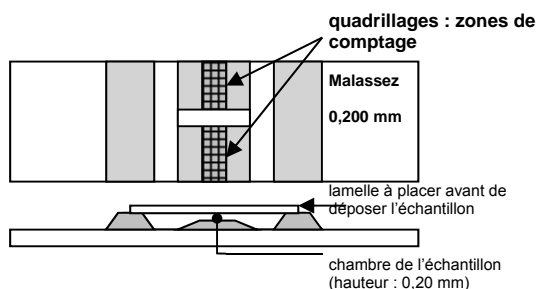
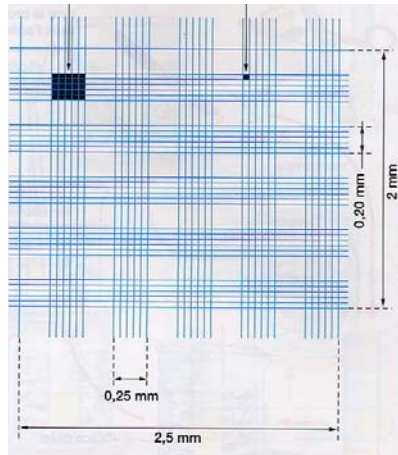


Figure 1 : Procédure d'utilisation de kit de dilution sanguine en vue de la réalisation de numération.





B

Figure 2: Hématimètre de Malassez (vues de face et de profil) (A) avec visualisation de la grille de lecture (B).
Le quadrillage est composé de 100 rectangles (1 rectangle : L=0,25 mm x l=0,20 mm x h=0,20mm)
Chaque rectangle correspond à un volume de 0,01mm³ et l'ensemble de la cellule à 1mm³.

Après quelques minutes (le temps que les cellules se déposent au fond du quadrillage), on observe la lame au grossissement x400 et on dénombre l'intégralité de la population cellulaire concernée qui se trouve dans le quadrillage. On obtient alors la numération pour un microlitre en tenant compte de la dilution du kit donnée par le fabricant.

		<i>Chien</i>	<i>Chat</i>	<i>Cheval de sang</i>	<i>Bovin</i>
Hématies	(x10 ¹² /l)	6,8 (5,5-8,5)	7,5 (5,0-10,0)	8,3 (6,8-12,9)	7,0 (5,0-10,0)
Hémoglobine	(g/l)	150 (120-180)	120 (80-150)	144 (110-190)	110 (80-150)
Hématocrite (ou PCV)	(%)	45 (37-55)	37 (24-45)	41 (32-53)	35 (24-46)
VGM	(fl)	70 (60-77)	45 (39-55)	45,5 (37-58,5)	52 (40-60)
TCMH	(pg)	22,8 (19,5-24,5)	15 (12,5-17,5)	15,9 (12,3-19,7)	14,0 (11,0-17,0)
CCMH	(g/l)	340 (320-360)	330 (310-350)	352 (310-386)	327 (300-360)
Réticulocytes	(%)	0-1,5	0,2-1,6	0	0
Diamètre	(µm)	7 (6,7-7,2)	5,8 (5,5-6,3)	5,5 (5-6)	5,8 (4-8)
Durée de vie	(jours)	100-120	66-78	140-155	160
Leucocytes	(x10 ⁹ /l)	11,5 (6-17)	12,5 (5,5-19,5)	9,05 (5,4-14,3)	8,00 (4,0-12,0)
Neutrophiles jeunes	(%)	0,8 (0-3)	0,5 (0-3)	0,5 (0-2)	0,5 (0-2)
	(/µl)	0-300	0-300	0-100	0-120
Neutrophiles matures	(%)	70 (60- 77)	59 (35-75)	53 (22-72)	28 (15-45)
	(/µl)	3000-11500	2500-12500	2260-8580	600-4000
Eosinophiles	(%)	4 (2-10)	5,5 (2-12)	3,5 (0-10)	9,0 (0-20)
	(/µl)	100-1250	0-1500	0-1000	0-2400
Basophiles	(%)	rares	rares	0,5 (0-4)	0,5 (0-2)
	(/µl)	-	-	0-290	0-200
Lymphocytes	(%)	20 (12-30)	32 (20-55)	39 (17-68)	58 (45-75)
	(/µl)	1000-4800	1500-7000	1500-7700	2500-7500
Monocytes	(%)	5,2 (3-10)	3 (1-4)	4,5 (0-7)	4,0 (2-7)
	(/µl)	150-1350	0-850	0-1000	25-840
Plaquettes	(x10 ⁹ /l)	300 (200-500)	450 (300-800)	225 (100-350)	500 (100-800)

Tableau 1: Intervalles de référence hématologiques chez l'animal sain adulte(11)

III.2. Le microhématocrite (Packed Cell Volume) :

Il est réalisé à l'aide d'une micro-centrifugeuse. L'analyse du tube capillaire -ou tube à micro-hématocrite- après centrifugation permet de mesurer l'hématocrite, d'apprécier le buffy-coat et la couleur du plasma.

Une autre façon de contrôler son automate d'hématologie est de réaliser un micro-hématocrite manuel grâce à une micro-centrifugeuse. A l'exception du VetAutoread (Idexx), les automates d'utilisation courante en pratique vétérinaire calculent l'hématocrite grâce à deux paramètres qu'ils mesurent : la numération érythrocytaire et le volume globulaire moyen (VGM). Ainsi, une concordance entre l'hématocrite fourni par l'analyseur et le micro-hématocrite manuel peut servir de base à la validation des résultats chiffrés donnés par l'analyseur, au moins pour ce qui concerne les hématies.

L'hématocrite s'exprime en **L/L** (litre de globules rouges par litre de sang) mais dans la pratique quotidienne, il est souvent exprimé en **%**.

($l/l = \% \times 10^{-2}$)

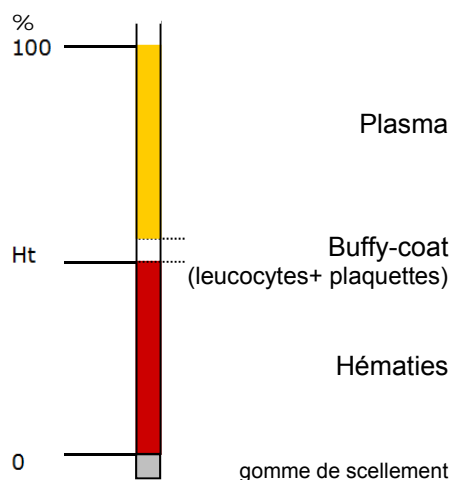


Figure 3 : les différentes couches du micro-hématocrite après centrifugation

Chez le Chien, le buffy-coat est constitué comme chez l'homme des plaquettes et des leucocytes alors que chez les bovins ou les ovins les granulocytes neutrophiles sont mélangés aux globules rouges en raison de leur plus forte densité(1). La séparation des leucocytes chez le chien sur gradient continu de Percoll (Figure 4) a montré que la densité des différents types de leucocytes variait peu et que les lymphocytes se mélangeaient aux granulocytes éosinophiles(12).

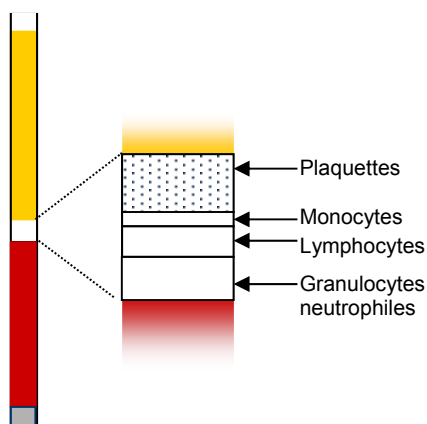


Figure 4 : les différentes couches du buffy-coat chez le Chien

III.3. L'hémoglobininémie

L'hémoglobininémie est appréciée par colorimétrie (transformation de l'hémoglobine en cyan-hémoglobine) après lyse des globules rouges. La lecture est faite à 540nm. Les automates d'hématologie sont pour la plupart équipés d'un spectrophotomètre. Elle s'exprime en g/l (Unité Internationale) mais la plupart des automates l'expriment en g/dl.

III.4. Les paramètres érythrocytaires

Les indices érythrocytaires sont l'expression de la taille des hématies et de leur teneur en hémoglobine. Ils servent à classer les anémies. Au nombre de trois, ils sont calculés à partir des analytes mesurés.

- **Volume Globulaire Moyen :**
(Mean Corpuscular Volume)

$$\text{VGM (femtolitres (10}^{-15}\text{ l))} = \frac{\text{Hématocrite (l/l)}}{\text{Numération GR (10}^{12}\text{/l)}}$$

- VGM↗ : population macrocytaire (macrocytose)
- VGM↘ : population microcytaire (microcytose)

- **Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine :**
(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

$$\text{CCMH (g/l)} = \frac{\text{Hémoglobininémie (g/l)}}{\text{Hématocrite (l/l)}}$$

- CCMH↘: population hypochrome

- **Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine :**
(Mean Corpuscular Hemoglobin)

$$\text{TCMH (picogrammes)} = \frac{\text{Hémoglobine (g/l)}}{\text{Numération GR (10}^{12}\text{/l)}}$$

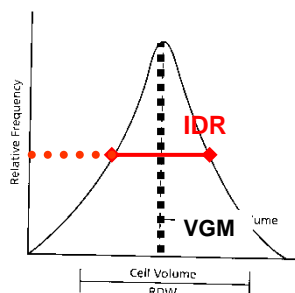
= poids d'Hb contenu en moyenne dans une hématie

- TCMH↘: population hypochrome

Ces paramètres sont soit mesurés, soit calculés selon l'automate d'hématologie considéré. Le principe de fonctionnement des différents automates sera envisagé ultérieurement.

III.5. L'indice de distribution des globules rouges (IDR) ou Red blood cells Distribution Width (RDW).

Ce paramètre est le reflet de l'anisocytose (variation de taille) des globules rouges(13-15). Il représente le coefficient de variation des volumes globulaires et peut être visualisé sur un érythrogramme.



RDW est calculé par les automates selon :

$RDW = (SD\ MCV \div \text{moyenne MCV}) \times 100.$

Une augmentation de l'IDR indique donc la présence d'une sous-population d'hématies plus grandes ou plus petites (ou les deux) que celles représentées par le VGM.

IV. Les cellules sanguines

IV.1. Les globules rouges

Les hématies sont des cellules sanguines anucléées chez les Mammifères, qui contiennent un pigment rouge caractéristique de la lignée: l'hémoglobine. Ce pigment est capable de fixer de façon réversible l'oxygène et une fraction du gaz carbonique transporté dans le sang et confère aux hématies un rôle primordial dans les échanges respiratoires entre l'air, le sang et les tissus.

Cytologie

Sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa ou avec une coloration rapide, les globules rouges apparaissent anucléés, éosinophiles. Vue de face, l'hématie est une cellule arrondie, discoïde à centre clair chez le Chien (disque biconcave), sans pâleur centrale chez le Chat, le Cheval et le Bovin (hématie plus sphérique)(15-19). Leur diamètre varie en fonction de l'espèce animale : 7µm chez le Chien et 5,5 à 6 µm en moyenne chez le Chat et le Cheval respectivement et 4 à 8 µm chez les Bovins (Tableau 1).

Chien :

- ✓ la pâleur centrale des hématies facilite l'observation des sphérocytes dans cette espèce ; cette décoloration centrale disparaît en bordure de frottis là où les forces d'étirement du sang sont importantes
- ✓ anisocytose et poïkilocytose légères
- ✓ formation de rouleaux modérée

Chat:

- ✓ anisocytose modérée
- ✓ formation de rouleaux modérée à marquée

Cheval :

- ✓ formation de rouleaux marquée secondaire à une vitesse de sédimentation des globules rouges rapide

Bovin :

- ✓ anisocytose légère à modérée
- ✓ présence possible d'acanthocytes

Réticulocytes : les réticulocytes sont des hématies anucléées et immatures qui contiennent de grandes quantités d'ARN ribosomal et mitochondrial et des organelles nécessaires aux synthèses protéiques, visibles lors de coloration vitale par le bleu de méthylène ou le bleu de crésyl brillant. Ils sont légèrement plus volumineux que des hématies mûres. Ils sont libérés de façon prématurée par la moelle osseuse en réponse à une concentration élevée d'érythropoïétine sécrétée par le rein lors d'anoxie tissulaire consécutive d'une anémie. Les réticulocytes reflètent, lorsqu'ils sont en nombre élevé, une érythropoïèse exacerbée (cf cours Anémies).

Sur un frottis sanguin coloré par le May-Grünwald Giemsa, l'ARN est dissous durant la fixation alcoolique et donne une coloration légèrement basophile (polychromatophile) à la cellule.

Corps de Howell-Jolly : Il correspond à un reliquat nucléaire présent de façon rare chez le Chien, et occasionnelle (1 %) chez le Chat et le Cheval, sous la forme d'une ponctuation basophile dans le cytoplasme d'un globule rouge mûr.

Normalement ce fragment nucléaire est éliminé par la rate. Il est plus fréquent d'observer des corps de Howell-Joly dans les hématies d'animaux présentant une rate non fonctionnelle ou bien splénectomisés.

IV.2. Les globules blancs

Les leucocytes sont composés de cinq types cellulaires qui morphologiquement sont subdivisés en deux familles :

- ✓ les granulocytes ou polynucléaires :
 - neutrophiles
 - éosinophiles
 - basophiles
- ✓ les agranulocytes ou leucocytes mononucléés : - lymphocytes
 - monocytes

Les granulocytes présentent des granulations cytoplasmiques visibles en microscopie photonique. Après coloration par le May-Grünwald Giemsa (MGG), trois types de granulocytes sont définis selon l'affinité tinctoriale de leurs granulations spécifiques : éosinophiles, basophiles et neutrophiles (peu ou pas colorées). Les granulocytes possèdent par ailleurs un noyau polylobé qui amena les premiers cytologistes à parler de « polynucléaires » pensant que ces cellules étaient plurinucléées.

Lymphocytes et monocytes possèdent un noyau « plein » et sont qualifiés de leucocytes mononucléés. A nouveau dans un souci de classification, le terme d'agranulocytes est parfois employé pour souligner qu'aucune granulation n'est visible en microscopie photonique et les différencier des granulocytes.

Les leucocytes exercent leurs fonctions dans les tissus ; le sang ne faisant qu'assurer leur transport entre les lieux de formation et de réserve (moelle osseuse) et d'activité (tissus). Le nombre et la nature des leucocytes circulants dépendent des demandes tissulaires.

IV.2.1. Les granulocytes neutrophiles (GNN) :

Le GNN est une cellule de défense de l'organisme contre la pénétration de microorganismes, en première intention de bactéries. Les granulocytes neutrophiles vont séjourner quelques heures dans la circulation sanguine avant de gagner les tissus dans lesquels ils vont exercer leurs fonctions. La durée de demi-vie d'un GNN sanguin est de 6 à 10 heures ; l'ensemble des GNN circulants est donc remplacé deux à trois fois en 24 heures. Une fois que le GNN quitte le sang et migre dans les tissus, il ne pourra plus réintégrer le compartiment sanguin.

Dans le compartiment vasculaire, la moitié environ des GNN est présente dans le secteur circulant c'est-à-dire en mouvement dans le courant sanguin ; c'est cette population qui est prélevée au cours d'une ponction veineuse. La moitié restante de GNN est présente dans le secteur marginé c'est-à-dire sous la forme de cellules accolées à l'endothélium des vaisseaux sanguins principalement des veinules et des capillaires.

Leucocytose physiologique secondaire à une sécrétion d'adrénaline : lors de stress (peur, effort musculaire, excitation), l'adrénaline induit une démargination des GNN du secteur marginé au secteur circulant. Une « pseudo-neutrophilie » est donc observée sur l'hémogramme. Une lymphocytose peut être observée conjointement et proviendrait d'une mobilisation des lymphocytes issus du conduit thoracique ou bien d'une incapacité de ces cellules à migrer vers les tissus(20).

Leucocytose observée sous l'effet des glucocorticoïdes endogènes : lors de stress intense, une leucocytose qui va de 15 à 40 $10^9/l$ peut être observée et se caractérise par une neutrophilie, une lymphopénie, une monocytose et une éosinopénie. La neutrophilie est secondaire à la diminution de migration des GNN du secteur circulant au secteur tissulaire, à un passage accru des GNN médullaires mûrs dans le sang et à une démargination des GNN marginés vers le sang.

La monocytose résulte d'une mobilisation des monocytes marginés ; l'éosinopénie provient d'une diminution du passage des GNE médullaires vers le sang ; la lymphopénie découle d'une redistribution des lymphocytes circulants (sang, lymphes et organes lymphoïdes).

Cytologie (après coloration au MGG)(15-19) :

Cellule de taille moyenne (12 à 15 μm de diamètre) au rapport nucléo-cytoplasmique assez faible

Noyau : polylobé (souvent au moins trois lobes mais l'aspect rubané habituel rend le décompte exact du nombre de lobes assez délicat). La chromatine apparaît dense, en mottes violet foncé.

- «*Band cell*» ou *granulocyte non segmenté*: jeune granulocyte dont le noyau n'est pas encore segmenté. Le noyau est incurvé en forme de fer à cheval ou de J et présente une chromatine moins dense, plus claire que le granulocyte mûr. Présents en faible nombre.

- *Corpuscule de Barr* ou «*drumstick*» : appendice sexuel en forme de baguette de tambour appendu à l'un des lobes nucléaires. Visible chez individus de sexe femelle (1 à 10% des GNN chez la Chienne, 4 à 11% chez la Chatte).

Cytoplasme : incolore, ou légèrement rosé chez le Chien, aux fines granulations peu nettes voire invisibles (différent de l'Homme).

IV.2.2. Les granulocytes éosinophiles (GNE)(15-19) :

Les GNE possèdent des capacités de diapédèse et de chimiotactisme identiques à celles du GNN mais les stimuli sont différents. Les GNE mûrs circulent dans le sang quelques heures puis gagnent les tissus où ils peuvent demeurer plusieurs jours voire plusieurs semaines. Ils ne peuvent cependant pas réintégrer le compartiment sanguin après diapédèse. Leur production et leur chimiotactisme sont stimulés par des facteurs solubles produits par des mastocytes, des lymphocytes T sensibilisés et des macrophages. Bien que les GNE soient capables de bactéricidie, ils sont spécialisés dans la destruction des parasites. Cette dernière fonction ne fait pas appel à la phagocytose mais à des phénomènes de cytotoxicité.

Cytologie (après coloration au MGG) :

Les GNE diffèrent d'une espèce à l'autre et représentent un des critères qui permettent de réaliser la diagnose d'espèce lors de la lecture d'un frottis sanguin(16-19).

Cellule de taille voisine à légèrement supérieure (12 à 18 µm de diamètre) à celle du GNN.

Noyau : généralement peu lobé, souvent bilobé, à chromatine dense basophile.

Cytoplasme : les granulations spécifiques sont différentes selon l'espèce :

Chien: granulations éosinophiles (orangée à marron), arrondies de taille très variable (2 à 5 µm). Le nombre et la taille de ces granulations sont très variables chez le Chien.

IV.2.3. Les granulocytes basophiles (GNB) et les mastocytes(15-19) :

Les GNB sont fréquemment comparés aux mastocytes en raison de similarités morphologiques et fonctionnelles. Leur origine respective n'est cependant pas totalement connue. Les GNB sont formés et mûrissent dans la moelle osseuse alors que les mastocytes issus d'une cellule souche médullaire pluripotente se différencient dans les tissus.

Les GNB sont rarement rencontrés dans le compartiment vasculaire chez l'animal (à l'exception du Lapin) ou chez l'Homme alors que les mastocytes sont visibles dans les tissus. Les mastocytes sont rares dans le sang bien qu'occasionnellement on en rencontre sur un étalement réalisé à partir d'un buffy coat.

Les GNB circulent quelques heures dans le sang avant de migrer dans les tissus où ils peuvent survivre quelques jours. Les mastocytes à l'inverse peuvent y demeurer des jours voire des semaines. Les GNB jouent un rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, particulièrement dans l'anaphylaxie et l'hypersensibilité cutanée mais les stimuli ne sont pas bien connus. Les granulations des GNB et des mastocytes sont riches en histamine, héparine, sérotonine et en acide hyaluronique.

Cytologie (après coloration au MGG) :

Les GNB sont différents d'une espèce à l'autre.

Cellule de taille voisine à supérieure à celle d'un GNN (12 à 18 µm de diamètre).

Noyau : polylobé

Cytoplasme :

Chien: quelques rares granulations violet foncées sont dispersées sur un fond de cytoplasme basophile pâle à rose violacé. Dans certains GNB, les granulations ne sont pas visibles.

Chat: le cytoplasme est entièrement occupé par de nombreuses petites granulations rondes bleu lavande. Les granulations se superposent sur le noyau et lui donne l'aspect d'un « noyau grignoté » à l'image d'un trognon de pomme.

Cheval et Bovin: nombreuses petites granulations basophiles foncées qui peuvent masquer le noyau.

N.B. : Cytologie du mastocyte : quelle que soit l'espèce animale, cellule de taille similaire à celle des GNB.

Noyau : round à ovale, central à excentré

Cytoplasme : nombreuses petites granulations violacées foncées qui peuvent masquer le noyau.

IV.2.4. Les lymphocytes(15-19)

Les lymphocytes sont produits par une cellule souche médullaire pluripotente ; certains précurseurs lymphocytaires quittent la moelle osseuse et gagnent le thymus où ils deviennent des lymphocytes T immunocompétents ; d'autres demeurent dans la moelle osseuse et sont à l'origine des lymphocytes B. Les lymphocytes mûrs sont rencontrés principalement dans les organes lymphoïdes et les vaisseaux lymphatiques.

Les deux classes fonctionnelles de lymphocytes, T et B, ne peuvent être distinguées morphologiquement par microscopie photonique après coloration conventionnelle au MGG. Leur reconnaissance spécifique se fait par immunohistochimie ou immunocytochimie.

Le sang permet la circulation des lymphocytes entre les tissus lymphoïdes et les autres tissus de l'organisme.

Lymphocytose physiologique :

Chien : la lymphocytose physiologique est rare. Elle est plus fréquemment présente chez le jeune, lors d'excitation avec sécrétion d'adrénaline. Les jeunes chiens ont un nombre plus important de lymphocytes que les adultes avec, jusqu'à l'âge de 6 mois des valeurs qui atteignent au moins $2 \cdot 10^9/l$.

Chat :

Chez les individus de moins d'un an, la lymphocytose est fréquente avec une inversion de formule. Dans ce cas, le nombre total de leucocytes est compris dans l'intervalle des valeurs physiologiques mais le pourcentage des lymphocytes est supérieur au pourcentage des GNN.

Lors de stress lié à la contention, à la peur ou à une prise de sang notamment, une sécrétion d'adrénaline induit une leucocytose dominée par une lymphocytose induite par la redistribution des lymphocytes entre les différents secteurs. Ce phénomène est de courte durée et persiste 20 à 30 minutes environ(20).

Sous l'effet de l'adrénaline, le chaton mais aussi le chat adulte peuvent présenter des leucocytoses avec des lymphocytoses qui atteignent parfois $20 \cdot 10^9$ lymphocytes /l voire $36 \cdot 10^9/l$.

Lors de stress avec sécrétion de glucocorticoïdes endogènes, une leucocytose survient également avec une neutrophilie, une éosinopénie et une lymphopénie. La monocytose décrite chez le Chien n'est pas notée.

Cytologie (après coloration au MGG) :

Quelle que soit l'espèce animale, il existe plusieurs variantes morphologiques de lymphocytes :

- **Petit lymphocyte** (6 à 9 μm): cellule arrondie, à rapport nucléo-cytoplasmique (RNP) très élevé. Physiologiquement, les petits lymphocytes sont les plus nombreux dans le sang.

Noyau : rond, parfois encoché, excentré, à chromatine dense, mottée.

Cytoplasme : réduit, incolore à basophile. Il se résume parfois à un fin liseré que l'on ne visualise pas toujours sur tout le pourtour de la cellule.

- **Moyen et grand lymphocytes** (10 à 15 μm):

RNP plus faible.

Noyau : la chromatine apparaît moins dense, laquée.

Cytoplasme : comparable à celui du petit lymphocyte ; il contient parfois (Chien, Chat, Cheval) à fréquemment (Bovins) quelques granulations magenta dites azurophiles (lymphocytes à grains) souvent regroupées près d'un côté du noyau.

➤ Bovins : l

- les grands lymphocytes se confondent aisément avec les monocytes en raison de la présence d'un noyau parfois indenté ou profondément encoché et d'un cytoplasme bleuté à grisé contenant de petites vacuoles claires. A la différence des monocytes, le noyau ne sera jamais bilobé et leur caractérisation cytochimique et immuno-histochimique est différente,
- les granulations azurophiles, lorsqu'elles sont présentes, sont de taille, de forme et en nombre variables.

IV.2.5. Les monocytes(15-19)

Les monocytes sont issus d'une cellule souche qui est également à l'origine de la production des GNN. L'interleukine 3 et le facteur de croissance GM-CSF régulent ce processus. La maturation médullaire du monoblaste en monocyte est continue et se déroule plus rapidement que celle du GNN. Les monocytes mûrs ne sont pas stockés dans la moelle osseuse et gagnent la circulation sanguine suite à leur maturité. Pour cette raison, très peu de monocytes sont observés sur des étalements de moelle osseuse. De la même façon, quand un patient récupère d'une myélosuppression d'origine toxique ou infectieuse, la monocytose précède de un à deux jours le retour des GNN et peut être considérée comme bon pronostic.

Les monocytes semblent avoir peu de fonction dans le sang circulant. Après 12 à 26 heures, ils quittent le compartiment circulant et gagnent les tissus où ils se différencient en **macrophages** où ils vivent des semaines à des années à la différence des GNN. Ils répondent à la pénétration de microorganismes, à la présence de matériel nécrotique et à l'inflammation. Avec leur grande capacité de phagocytose et leur contenu important en enzymes hydrolytiques, les macrophages englobent et détruisent les débris tissulaires.

La diapédèse des monocytes est inhibée par les corticostéroïdes. En conséquence, neutrophilie et monocytose s'observent chez des animaux traités avec des stéroïdes.

Monocytose : le nombre de monocytes circulants peut augmenter dans tout désordre aigu ou chronique caractérisé par une augmentation de la demande tissulaire en phagocytes ou lors de réponse immunitaire. Donc tout processus qui stimulera une neutrophilie stimulera également une monocytose par l'intermédiaire du GM-CSF.

Rappelons la neutrophilie et la monocytose observées sous l'effet de corticostéroïdes endogènes ou exogènes particulièrement chez le Chien.

Monocytopénie : sans signification clinique.

Cytologie (après coloration au MGG) :

La morphologie des monocytes est très variée mais il n'existe ni différence spécifique ni variation physiologique.

Cellule de taille moyenne à grande (20 à 30 μm de diamètre), à RNP moyen et à contours irréguliers.

Noyau : de forme très variable : rond, multilobé, réniforme, en massue, en forme de fer à cheval, de S, d'haltère.... La chromatine y est fine, dite peignée (beaucoup moins dense que dans les noyaux des granulocytes par exemple).

Cytoplasme : modéré à abondant, « gris ciel d'orage » ou « gorge de pigeon » (fond violacé avec des granulations azurophiles plus ou moins distinctes, en poussière). Il peut contenir également des vacuoles claires, optiquement vides ainsi que des éléments phagocytés de nature très diverse.

IV.3. Les plaquettes sanguines(15-19)

Les plaquettes sanguines sont les plus petits éléments figurés sanguins. Chez les Mammifères, ce sont des cellules sanguines anucléées, sans pigment, issus de la fragmentation du cytoplasme d'un précurseur cellulaire médullaire : le mégacaryocyte.

Elles jouent un rôle dans l'hémostase. Les plaquettes sont les acteurs essentiels dans l'hémostase

Les plaquettes demeurent environ 7 à 10 jours dans la circulation. Les jeunes plaquettes qui viennent d'être libérées sont plus grandes que les formes plus âgées. Par contre, sur un frottis sanguin, toutes les grandes plaquettes observées ne sont pas forcément de jeunes plaquettes.

Au fur et à mesure qu'elles circulent dans le compartiment vasculaire les plaquettes deviennent plus petites et parfois aussi moins fonctionnelles. Elles sont alors retirées de la circulation. En temps normal, les deux tiers du pool plaquettaire sont circulants et le tiers restant est stocké dans la pulpe rouge splénique. Une splénocontraction au cours d'un exercice ou lié à un stress entraîne une augmentation du nombre de plaquettes circulantes.

Cytologie (après coloration au MGG) :

Cellule anucléée de 1,5 à 4,5 μm , de forme arrondie ou ovale, le plus souvent plus petites que les hématies. Au très fort grossissement, en microscopie photonique, elles apparaissent comme de petits disques biconvexes. La cellule renferme en son centre de nombreuses granulations azurophiles à violettes qui délimitent le granulomère alors que la périphérie cellulaire apparaît grisâtre à peu colorable et agranulaire (hyalomère).

Sur un frottis, granulomère et hyalomère se distinguent difficilement. La coloration des plaquettes dépend beaucoup de la coloration notamment du Giemsa. Si le temps de coloration n'est pas respecté, elles sont difficiles à voir. Elles apparaissent généralement pâles, légèrement bleutées avec des granulations rosâtres en position centrale.

Au faible grossissement, on peut observer des amas plaquettaires en périphérie et en queue de frottis. De tels amas sont à signaler car ils provoquent une sous-estimation de la numération plaquettaire par les automates d'hématologie. Cette observation est fréquente chez le Chat.

Chien : généralement, leur taille avoisine le quart voire la moitié d'un GR mais certaines sont plus grosses qu'une hématie. Les granulations sont visibles soit concentrées au centre soit réparties dans l'ensemble de la cellule.

Occasionnellement, des plaquettes sont en voie d'activation et prennent un aspect échevelé ou arachnoïde avec de courts pseudopodes. Des plaquettes activées peuvent former des agrégats plaquettaires déjà évoqués.

Chat : les plaquettes félines présentent une cytologie comparable aux autres espèces à l'exception de la présence occasionnelle de formes allongées dites géantes (mégaplaquettes).

Le stress lié à une prise de sang chez le Chat provoque une libération brutale de plaquettes dans la circulation.

Les plaquettes félines ont par ailleurs tendance à s'agréger après ponction veineuse.

Cheval : les granulations azurophiles sont si minuscules qu'elles sont difficiles à voir à l'objectif à l'immersion. Par ailleurs les concentrations plaquettaires du Cheval sont parmi les plus basses des Mammifères.

Références bibliographiques

- 1 Guelfi JF. L'hémogramme. In: Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., editor. L'hématologie du chien en pratique vétérinaire. Paris; 2006. p. 7-14.
- 2 Jain NC. Examination of the blood and bone marrow. In: Jain NC, editor. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 1-18.
- 3 Moritz A, Becker M. Automated hematology systems. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., editors. Schalm's Veterinary Hematology, sixth edition. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010. p. 1054-66.
- 4 Ledieu D. Hémogramme blanc. Encyclopédie vétérinaire, Biologie clinique, 0200, 8p. 2003.
- 5 Ledieu D. Hémogramme rouge. Encyclopédie vétérinaire, Biologie clinique, 0050, 10p. 2003.
- 6 Thrall M, Baker DC, Campbell TW, et al. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Blackwell Publishing, Ames, Iowa.; 2006.
- 7 Cohle SD, Saleem A, Makkaoui DE. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. Am J Clin Pathol. 1981 Jul;**76**(1):67-9.
- 8 Wood BL, Andrews J, Miller S, Sabath DE. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. Am J Clin Pathol. 1999 Nov;**112**(5):687-95.
- 9 Guelfi JF. Renseignements fournis par l'examen de la morphologie des globules rouges sur un frottis sanguin chez le chien et le chat. Prat Med Chir Anim Comp. 1995;**30**:639-46.
- 10 Guelfi JF. Le frottis sanguin: examen des leucocytes chez le chien et le chat. Le point vétérinaire. 1993;**25**(154):85-6.
- 11 Jain NC. Comparative hematology of common domestic animals. In: Jain NC, editor. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 19 -53.
- 12 Buurman WA, Vegt PA, Groenewegen G, van der Linden CJ, Jeunhomme GM. Analysis of buoyant density of canine peripheral blood leukocytes with PVP-Silica (Percoll) density gradients. Vet Immunol Immunopathol. 1982 Nov;**3**(6):547-56.
- 13 Neiger R, Hadley J, Pfeiffer DU. Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. Vet Rec. 2002 Apr 6;**150**(14):431-4.
- 14 Perret D., Trumel C., Diquélou A., Dossin O., Guelfi JF. L'indice de distribution des globules rouges (IDR) chez le chien. Analyse de 1400 cas. Revue de médecine Vétérinaire. 2001;**152**:549-54.

- 15 Harvey JW. Veterinary Hematology: a diagnosis guide and color atlas: Elsevier Saunders; 2012.
- 16 Grondin T.M., Dewitt S.F. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., editors. Schalm's Veterinary Hematology, sixth edition. Ames, Iowa, U.S.A.: Wiley-Blackwell; 2010. p. 821-8.
- 17 Rizzi T.E., Clinkenbeard KD, Meinkoth JH. Normal hematology of the cat. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., editors. Schalm's Veterinary Hematology, sixth edition. Ames, Iowa, U.S.A.: Wiley-Blackwell; 2010. p. 811-20.
- 18 Rizzi T.E., Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the dog. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., editors. Schalm's Veterinary Hematology, sixth edition. Ames, Iowa, U.S.A.: Wiley-Blackwell; 2010. p. 799-810.
- 19 Wood D., Quiroz-Rocha G. Normal hematology of cattle. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., editors. Schalm's Veterinary Hematology, sixth edition. Ames, Iowa, U.S.A.: Wiley-Blackwell; 2010. p. 829-35.
- 20 Bourgès-Abella N., Diquélou A., Trumel C. Les leucocytes: valeurs usuelles et variations physiologiques chez le chien et le chat. Le nouveau praticien vétérinaire. 2004(Février-Mars):9-12.